云南植物研究 1988;10(2):159—166
Acta Botanica Yunnanica

根癌农杆菌T-DNA在向日葵离体组织中的转移与表达

许 耀 贾敬芬 郑国锠

(兰州大学生物系,兰州)

摘要 利用根癌农杆菌B6S3和T37菌株离体感染向日葵切伤的子叶、下胚轴外植体。感染处理的外植体与菌共培养三天后,在无激素条件下以60—96%的频率获得了离体转化的瘤组织。瘤组织在继代培养过程中具有激素自主性生长特性。在无激素培养基上瘤组织的生长速率显著高于正常愈伤组织。所有随机取样测定的瘤组织内均有相应冠瘿碱的存在。

关键词 离体转化;T-DNA转移;冠瘿碱合成酶;激素自主性生长

Marton等[1]通过原生质体再生新壁的单细胞和根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)共培养建立了植物细胞的离体转化系统。尔后,这一方法又被应用到愈伤组织[2]和悬浮培养细胞[3]的离体转化。然而,这一转化系统不仅受细胞培养中许多因素的限制,而且转化效率也较低。Horsch等[4,5]发展了一种叶圆片转化-再生方法。本实验在上述离体转化系统的基础上,以向日葵(*Helianthus annuus* L.)为材料。建立了一种向离体外植体转移外源基因的转化方法。利用这一方法不仅简便有效、易于选择,而且适用范围广。

材料和方法

1.菌株

选用根癌农杆菌的B6S3(含pTiB6S3的章鱼碱型菌株)和T37(含pTiT37的胭脂碱型菌株)为供试菌株。细菌在YEB固体培养基[6]上进行繁殖与保持。液体悬浮培养时,从固体培养基上的菌落中取2环接于10ml YEB培养液中。混匀后,放置于恒温振荡器内。在28℃、120rpm黑暗条件下振荡培养。细菌的生长速度(一定时期的菌液浓度)根据在666 nm波长下(或用绿色滤光片)菌液的吸光度来计算。

2.离体感染

将表面消毒过的向日葵种子播于无激素的K_3琼脂培养基[7]上。待无菌苗长至3 cm以上时,切取下胚轴和子叶。用解剖刀在每片子叶表面划痕3—5条。将下胚轴切成1 cm左右的小段。切好的子叶和下胚轴浸于已在28℃、120 rpm条件下振荡培养了17.5小时左右的B6S3和T37菌株的悬浮菌液。约20—30分钟后,从菌液中夹出浸过的子叶和下

1987-02-23收稿

胚轴，分别转至无激素的MS培养基（含蔗糖3%、琼脂0.6%、酵母粉500 mg/l）上。在培养间弱光下培养三天后，从培养基上的菌落里分别“捞出”与菌共培养过的外植体（图版Ⅰ，2、3），置于无菌瓶内。用无菌水洗涤8—10次。再用过滤灭菌的含有500mg/l羧苄青霉素（Cb）的上述MS培养液浸泡30分钟。以不在菌液中浸泡的子叶和下胚轴为相应对照（CK），其它程序相同。

3.转化组织的分离与培养

将上述洗涤和浸泡过的子叶和下胚轴分别转至含500 mg/l Cb的无激素MS琼脂培养基（记为MSH^-）中。将在MSH^-培养基上诱导出的愈伤组织作为假定的根癌农杆菌T-DNA转化组织，简称瘤组织。一月后，将之从母体组织上分离下来，在相同培养基上连续继代培养三次。第四次继代培养基中的Cb浓度减半。以后继代培养完全撤掉Cb。培养物生长量的大小以干、鲜重来表示。每一观察值至少30块培养物。计算方法为（终重－始重）/始重。

4.正常愈伤组织的诱导

将向日葵无菌苗来源的子叶和下胚轴接于MS＋6BA 0.5 mg/l＋IAA 1.0 mg/l的培养基（记作MSH^+）上诱导正常愈伤组织，并在这种培养基上继代培养。

5.冠瘿碱合成酶活性的鉴定

将待测组织切成小块转入含10mmol/l精氨酸＋5 mmol/l α-酮戊二酸（用于T37瘤组织的测定）或10 mmol/l精氨酸＋5 mmol/l丙酮酸钠（用于B6S3瘤组织的测定）的MS固体培养基上。培养2—3天后，用80%乙醇提取待测组织内的冠瘿碱。利用纸电泳-荧光显色法检测待测组织中是否具有章鱼碱合成酶或胭脂碱合成酶活性。电泳和显色条件同Otten等的方法[8]。

结 果

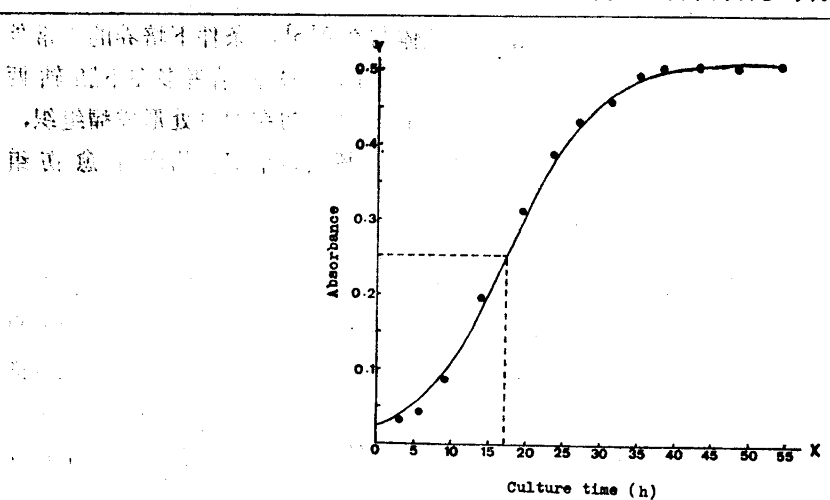
1.细菌的生长曲线

为了获得高活力的细菌培养液，特以B6S3菌株来测定根癌农杆菌的生长曲线。B6S3菌株在YEB液体培养基中的生长规律如图1所示。在28℃、120 rpm条件下，培养17.5小时为生长曲线的拐点值。它是细菌繁殖速率从愈来愈快转为开始变慢、且愈来愈慢的转折点。此时，细菌繁殖量达到最大值的一半。在离体感染实验中，利用此时培养的菌悬液具有较高的转化效率。

2.子叶、下胚轴外植体的离体转化

利用野生型根癌农杆菌不同菌株在田间水平上感染向日葵时，发现章鱼碱型菌株中的B6S3和胭脂碱型菌株中的T37对向日葵植株均具较强的致瘤能力（图版Ⅰ，1）。因此，在离体转化实验中选用了B6S3和T37这两种菌株。

向日葵外植体对B6S3菌株十分敏感。在MSH^-条件下培养6天时，开始有瘤状组织的发生。培养8天时，由T37菌株感染的部分子叶和下胚轴也开始形成瘤组织。三周时，感染的外植体上已产生了大量的瘤组织（图版Ⅰ，4、5、7、8）。部分外植体还直接从瘤组织中分化出了根（图版Ⅰ，11）。表1的结果表明，B6S3菌株对向日葵外



$$\hat{Y}=\frac{0.508}{1+20.3512e^{-0.172412x}}\qquad \gamma_{y'x}=-0.9264^{**}$$

图1　B6S3菌株在YEB液体培养基中的生长曲线

Fig. 1　Growth curve of *A. tumefaciens* strain B6S3 in YEB liquid medium

植体的离体转化能力高于T37菌株。尤其是B6S3菌株感染的子叶，不仅形成瘤组织的频率高，并且瘤组织的发生量也最多。然而，在MSH⁻条件下，对照组子叶完全不能产生愈伤组织（图版Ⅰ，9）；部分下胚轴在培养的一定时期内仅有膨大现象（图版Ⅰ，6）。

表1　不同根癌农杆菌菌株对向日葵子叶和下胚轴诱瘤作用的比较*

Table 1　Comparison of oncogenesis of sunflower explants *in vitro* treated by different strains of *A. tumefaciens**

菌系 Bacterial strain	外植体 Explant	处理数 No. treated	诱瘤作用 Induction of tumor tissue		
			瘤组织形成数 No. of tumor tissue formation	瘤组织形成量** Amount of tumor tissue**	频率 Frequency (%)
CK	子叶Cotyledon	41	0	0	0
	下胚轴Hypocotyl	37	膨大 bigger	—	—
B6S3	子叶Cotyledon	95	92	++++	96.8
	下胚轴Hypocotyl	68	58	+++	85.3
T37	子叶Cotyledon	51	31	+	60.8
	下胚轴Hypocotyl	70	58	++	82.9

*　三次独立实验的结果。 These results were obtained in three independent experiments.

**　瘤组织产生量的多少 Amount of tumor tissue formed: ++++ > +++ > ++ > +

在MSH⁻条件下培养的经细菌感染处理过的外植体与在MSH⁺条件下培养的正常外植体（CK）相比，愈伤组织的发生情形明显不同（图版Ⅰ，10）。前者多在下胚轴两端切伤部位产生瘤组织，随后发展成为典型的哑铃形；子叶起初在切口处形成瘤组织，但两周后其周围及表面均产生了瘤组织。在对照组中，下胚轴整个部位均产生愈伤组织，而子叶多在切口处形成愈伤组织。

3.瘤组织的继代培养及其生长特性

在MSH⁻条件下生长一月后，将离体转化形成的瘤组织在MSH⁻培养基上连续转代（约3—4周一次）培养。在最初继代培养过程中，各种来源的瘤组织几乎均具激素自主性生长特性（表2），并且色泽光亮、质地致密，个别瘤组织块甚至有根的分化（图版Ⅰ，11）。对照组的子叶切片仍无增殖能力，膨大的下胚轴组织也几乎不能进一步增殖生长（图版Ⅰ，12）。第三次继代培养以后，所有的瘤组织均可在无激素条件下迅速增殖。

向日葵正常愈伤组织在MSH⁺条件下生长速率很快。但当转到MSH⁻培养基上时，生长缓慢。培养25天后，变褐渐亡。在0—25天培养期间内，其生长曲线与在同样条件下培养的瘤组织生长曲线明显不同（图2）。分别由B6S3和T37菌系诱导的下胚轴瘤组织，无论是鲜重增加曲线、还是干重增加曲线均十分相似，即随着培养时间的延长迅速增加。但正常愈伤组织的干、鲜重-时间曲线十分平缓。

表2　向日葵离体转化的瘤组织在无激素培养基上的生长

Table 2　Growth of sunflower tumor tissue from *in vitro* transformation on hormone-free medium

菌系 Bacterial strain	组织来源 Tissue source	第一次继代培养 The 1st subculture 接种数 No. inoculated	增殖数 No. proliferated	%	第三次继代培养 The 3rd subculture 接种数 No. inoculated	增殖数 No. proliferated	%
CK	子叶Cotyledon	17	0	0	61	0	0
	下胚轴Hypocotyl	20	2	10.0	43	0	0
B6S3	子叶Cotyledon	66	65	98.5	57	57	100
	下胚轴Hypocotyl	44	44	100	78	76	97.4
T37	子叶Cotyledon	28	26	92.9	46	44	95.7
	下胚轴Hypocotyl	41	37	90.2	82	79	96.3

4.冠瘿碱合成酶基因在离体转化瘤组织中的表达

如上所述，用根癌农杆菌离体感染处理的向日葵子叶和下胚轴外植体不仅在无激素培养基上形成瘤组织，而且这些瘤组织在继代培养中保持着激素自主性生长特性。为了进一步鉴定T-DNA是否稳定地整合进宿主细胞中，分别测定了B6S3和T37菌株离体感染不同外植体后新形成的瘤组织及在MSH⁻培养基上继代培养了两代的瘤组织。结果表

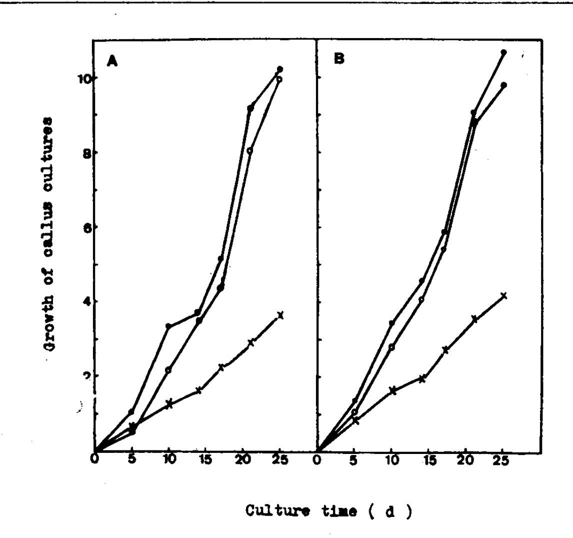


图 2　在无激素条件下向日葵冠瘿瘤组织与正常愈伤组织生长曲线的比较*

A：鲜重增加；　B：干重增加。

o——o B6S3株菌处理下胚轴后所产生的瘤组织系　•——• T37菌株处理下胚轴后所产生的瘤组织系

×——× 正常愈伤组织系　* 干、鲜重增加的计算为〔（终重/始重）－1〕

Fig. 2 Comparison of growth curves between crown gall cultures and normal callus of sunflower in hormone-free conditions*

A: Fresh weight increase;　B: Dry weight (100℃, 10h) increase

o——o Tumor line from hypocotyl treated by strain B6S3　•——• Tumor line from hypocotyl treated by strain T37

×——× Normal callus line induced by hormones

* Fresh and dry-weight increase were calculated as 〔(final weight/initial weight) － 1〕, and each value was obtained by weighing at least 30 pieces of cultures

明，所有随机取样测定的胭脂碱型瘤组织和章鱼碱型瘤组织内均有相应冠瘤碱的存在（图版Ⅰ，13）。表明离体转化的瘤组织中T-DNA编码的章鱼碱合成酶和胭脂碱合成酶基因得到了表达。

讨　论

虽然对根瘤农杆菌 Ti 质粒中DNA片段向植物细胞中转移的机制还不十分清楚，但这一感染-转化过程基本可以分为以下几步：细菌在宿主细胞上的附着；*Vir*区（即致病区，它编码T-DNA向宿主细胞转移过程中所需的功能基因）活性的诱导；DNA 由细菌中的转移；DNA向宿主细胞核中的转移；T-DNA 在宿主基因组中的整合及 T-DNA 基因的表达[9]。在离体感染程序中，将向日葵子叶、下胚轴外植体致伤，不仅利于细菌靠近或进入宿主细胞的原生质膜，而且可以刺激受伤部位细胞的分裂。以便与农杆菌共培养过程中在其DNA合成高峰期整合进 T-DNA。因为在植物 DNA 合成的高峰期使用DNA合成抑制剂能够抑制冠瘿瘤的形成[3]，看来植物细胞在合成 DNA 时才能得以转化。此外，受伤的植物细胞还利于产生诱导Ti质粒*Vir* 区基因活化的化合物（如酚类化合物），因为植物细胞中的特定产物能够诱导Ti质粒*Vir* 区基因的表达[10, 11]。使外植

体与细菌共培养，以促使T-DNA向宿主细胞中的转移。在无激素条件下瘤组织的形成是由于T-DNA基因的表达、改变了组织内激素平衡的结果。

利用我们所建立的离体转化程序，在向日葵外植体中以60—90%的频率获得了转化组织。离体感染形成的瘤组织在无激素条件下连续转代培养近一年后，仍然稳定地保持着激素自主性生长特性和冠瘿碱合成酶活性。这两种特性常被用于鉴定冠瘿瘤细胞的依据[12]。因此，离体转移到向日葵外植体组织内的根癌农杆菌T-DNA基因不仅稳定地整合进受体细胞的基因组中，并且在受体细胞中进行了表达。

发根农杆菌（*A. rhizogenes*）能够引起发根瘤是由于Ri（诱根）质粒中有一段DNA嵌入在宿主细胞的核基因组中[13]。离体感染的向日葵外植体新形成的个别瘤组织及其在最初培养中，能够分化根的原因不十分清楚，可能与最初组织中的内源激素水平有关。然而，在以后的继代培养中所有的瘤组织均保持为无分化结构的状态。曾设置多种处理企图由之再生，均未成功。冠瘿瘤细胞难于分化和再生的原因是由于野生型根癌农杆菌T-DNA中的致瘤基因在转化细胞中的表达所致，即与生长素合成有关的*tms*基因和与细胞分裂素合成有关的*tmr*基因协同作用的结果。

许多植物虽不能从原生质体或单细胞培养再生植株，但从组织水平上培养却能获得再生。因此，我们描述的离体转化系统适于所有对农杆菌敏感的植物进行离体转化，特别为那些原生质体目前还难于培养的植物进行遗传转化提供了可行的实验系统。并且对于再生转化的植株可能更为有效。此外，无论是对含野生型Ti质粒类型或人工构建的Ti质粒类型均可利用这一简便的程序来转化受体植物。在后者情况下，可根据构建的Ti质粒中所携带的标记基因特性（如卡那霉素抗性）的不同，只需将本程序中的选择条件稍加改变（如将激素自主性选择改为卡那霉素抗性选择）即可。在选择条件下分离与培养，还可以淘汰野生型的非转化细胞，从而获得纯合的转化体。

致谢 杨丹丹同志在实验中给予了大力协助。

参 考 文 献

1 Marton L, Wullems G J, Molendijk L et al. *Nature* 1979; **277**: 129—131
2 Muller A, Manzara T, Lurquin P F. *Bioche Biophy Res Comm* 1984; **123**: 458—462
3 Pollock K, Barfield D G, Robinson S J et al. *Plant Cell Rep* 1985; **4**: 202—205
4 Horsch R B. *Science* 1985; **227**: 1229—1231
5 McCormick S, Niedermeyer J, Fry J et al. *Plant Cell Rep* 1986; **5**: 81—84
6 Miller J H. Experiments in molecular genetics. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1972: 466
7 Nagy J I, Maliga P. *Z Pflanzenphysiol* 1976; **78**: 453—455
8 Otten L A B M, Schilperoort R A. *Bioche Biophys Acta* 1978; **527**: 497—500
9 Depicker A, Herman L, Jacobs A et al. *Mol Gen Genet* 1985; **201**: 477—484
10 Okker R J H, Spaink H, Hille J et al. *Nature* 1984; **312**: 564—566
11 Stachel S E, An G, Flores C et al. *EMBO J* 1985; **4**: 891—898
12 Nester E W, Gordon M P, Amasino R M et al. *Ann Rev Plant Physiol* 1984; **35**: 387—413
13 David C, Tempe J. *Bull Soc Bot Fr Actual Bot* 1985; **132**: 75—83

图版 I 说明（图版见本刊10卷 1 期）

1.根瘤农杆菌感染向日葵植株后产生的冠瘿瘤；2、3.分别为与根瘤农杆菌共培养的下胚轴和子叶外植体；4、5.分别为B6S3菌株和T37菌株离体感染下胚轴外植体后形成的瘤组织；6.未经农杆菌感染处理的下胚轴外植体（CK）；7、8.分别为B6S3菌株和T37菌株离体感染子叶外植体后形成的瘤组织；9.未经农杆菌感染处理的子叶外植体（CK）；10.不同处理条件下的子叶、下胚轴培养三周时愈伤组织发生状况的比较；11.从下胚轴形成的瘤组织中直接分化出的根（左）和瘤组织在继代培养中形成的根（右）；12.在无激素条件下不同组织在继代培养过程中的生长；13.不同组织内胭脂碱合成酶和章鱼碱合成酶活性的电泳图谱：（1）章鱼碱标准样品；（2）、（3）分别为在无激素条件下转移了两次的由B6S3菌株诱导的下胚轴和子叶瘤组织；（4）、（5）分别为B6S3菌株新诱导的下胚轴和子叶瘤组织；（6）正常的子叶愈伤组织；（7）精氨酸、章鱼碱和胭脂碱混合标样；（8）正常的下胚轴愈伤组织；（9）、（10）分别为在无激素条件下转移了两次的由T37菌株诱导的下胚轴和子叶瘤组织；（11）、（12）分别为T37菌株新诱导的下胚轴和子叶瘤组织；（13）胭脂碱标准样品。

TRANSFER AND EXPRESSION OF THE T-DNA HARBOURED BY AGROBACTERIUM TUMEFACIENS IN CULTURED EXPLANTS OF HELIANTHUS ANNUUS

Xu Yao, Jia Jingfen, Cheng Kuochang

(*Department of Biology, Lanzhou University, Lanzhou*)

Abstract The wounded cotyledon and hypocotyl explants from sunflower seedlings grown *in vitro* were soaked in suspension cultures of wild type strain B6S3 or T37 of *A. tumefaciens* which were at logarithmic growth phage. After 20—30 min the infected explants were transfered into MS medium lacking hormones and co-cultivated for three days at 25°C and weak light. The non-attached bacteria were then removed by washing the infected explants for 8—10 times. The selection for hormone-independent growth and elimination for the rest of the free bacteria were made in hormone-free medium supplemented with 500 mg/l carbenicillin.

Transformed tumor tissues from infected both cotyledon and hypocotyl explants haev been induced by *A. tumefaciens* with the *in vitro* transformation system. Frequencies of transformation were ca. 60—96%. Transformants were confirmed by their ability to proliferate tumor callus in hormone-free medium and to contain opine synthase activities in their tissues. In the process of subculture the isolated tumor tissues retained their growth trait of homone autonomy. In addition the growth rate of tumor tissues was much higher than that of normal callus cultures induced by hormones in hormone-free conditions. All of the transformed

tumor tissues mesured at random exisisted the corresponding opines. The results demonstrated that the hormone synthase gene and opine synthase gene coded by T-DNA were transfered, integrated, and expressed in transformed tissues.

Key words *In vitro* transformation; T-DNA transfer; Opines synthase; Hormone autonomy

Explanation of Plate I

1. Crown-gall formation on sunflower plant infected by *A. tumefacines*. 2 & 3 . Hypocotyl and cotyledon explants co-cultivating with *A. tumefaciens*. 4 & 5 . Tumor tissue formation from hypocotyl explants after *in vitro* infection of *A. tumefaciens* B6S3 and T37 respectively. 6. Uninfected hypocotyl explants (CK) with *A. tumefaciens*, but other procedures are same as those of the treatment. 7 & 8 . Tumor tissue formation from cotyledon explants after *in vitro* infection of *A. tumefaciens* B6S3 and T37 respectively. 9. Uninfected cotyledon explants (CK) with *A. tumefaciens*. 10. Comparison of callus formation from cotyledon and hypocotyl explants among different conditions of treatment at three weeks culture. 11. Differentiated roots directly from tumor tissue formed on the hypocotyl explants (Right) and those from subculturing tumor tissues (Left). 12. Growth of different tissues subcultured in hormone-free conditions. 13. Electropherogram of nopaline and octopine synthase activities in different tissues. Lane 1. Octopine standard. Lanes 2 & 3 . Tumor tissues induced by B6S3 from hypocotyl cotyledon which were subcultured for 2 passages in hormone-free medium. Lanes 4 & 5 . New tumor tissues from hypocotyl and cotyledon induced by B6S3. Lane. 6. Normal callus from cotyledon induced by hormones. Lane 7. Arginine, octopine, and nopaline standards. Lane 8. Normal callus from hypocotyl induced by hormones. Lanes 9 &10. Tumor tissues induced by T37 from hypocotyl and cotyledon which were subcultured for 2 passages in hormone-free conditions. Lanes 11&12. New tumor tissues from hypocotyl and cotyledon induced by T37. Lane 13. Nopaline standard.

Plate I appeared in *Acta Botanica Yunnanica* 1988; **10** (1).